

研究报告

一株厌氧嗜盐菌的鉴定

万波 李安明 赵海 刘克鑫

(中国科学院成都生物研究所 成都 610041)

摘要 从冬尖腌制品中分离到一株厌氧嗜盐菌(SEM), 该菌为革兰氏阴性杆菌, 大小为 $0.5 \times 6.0 \mu\text{m}$, 专性厌氧, 不运动, 不形成芽孢, 生长需要 $8\% \sim 25\% \text{NaCl}$, 最适生长盐浓度为 $12.5\% \sim 17.5\%$, 能利用多种糖和醇, 发酵葡萄糖产生丙酸和己酸。它应归属于严格厌氧嗜盐菌 *Haloanaerobe*, 但与已报道的几个种有较大差异, 是否为新种, 还有待于进一步研究。

关键词 厌氧的, 嗜高盐的, 厌氧嗜盐菌

1989年出版的伯杰氏系统细菌学手册第三册中^[1], Grant和Larsen把嗜盐菌正式定为6个属。另外, 能生长在高盐环境的细菌还有厌氧光合细菌属。但是, 1983年Zeikus等人描述了一株厌氧嗜盐菌(*Haloanaerobium praevalens*), 该菌的发现扩大了已知嗜盐微生物和已被承认厌氧细菌间的差异, 并且明显地区别于这两类菌^[2]。目前, 已报道的厌氧嗜盐菌主要分离于盐湖和死海, 而冬尖为芥类蔬菜发酵品, 其发酵在一个密闭的、高盐(16.1% NaCl)环境中进行。我们从冬尖中分离到一株厌氧嗜盐菌, 并对其进行鉴定研究, 现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 菌种来源

采自四川省资中酿造厂生产的一种芥类蔬菜发酵产品——冬尖。

1.2 培养条件

富集培养用加16.1% NaCl肝汤培养基^[3], 37°C 培养3~4d。

分离和生长培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 161; 酪蛋白 5; 酵母膏 5; 葡萄糖 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5; $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5; K_2HPO_4 1; NH_4Cl 0.5; 其它盐类溶液(MgCl_2 2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1;

$\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ 0.1; FeSO_4 0.1; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05; HBO_3 0.01; $\text{ALK}(\text{SO}_4)_2$ 0.01; NaMoO_4 0.01) 10ml; 维生素溶液(生物素 1; 叶酸 5; 对-氨基苯甲酸 10; 核黄素 5; 硫胺素 20; 尼克酸 20; 钴胺素 1; 泛酸 20; 盐酸吡多酸 20) 1ml; L-半胱氨酸 HCl 0.5; pH 7.5。

1.3 分离纯化

采用Hungate厌氧技术, 先用加盐肝汤培养基进行富集培养, 再进行稀释, 接种于加2%琼脂的分离和生长培养基上, 进行滚管, 经 37°C 培养7d后, 挑取滚管上单个菌落于分离和生长培养基中, 经 37°C 培养7d后, 再接种到加琼脂的分离和生长培养基上, 重复此过程, 直至分离物纯化为止。

1.4 鉴定方法

主要参照伯杰氏细菌手册及近年来有关的文献报道资料^[2, 4~8]。

1.4.1 形态特征: 采用革兰氏染色(用快速革兰氏染色法验证), 观察细菌的细胞形态, 测定其大小。观察滚管培养的生长情况。 37°C 培养3~4d。

1.4.2 厌氧试验: 用三种培养基进行测定, 其培养基配制为: 好氧培养基按好氧方法; 厌氧培养基按 Hungate 厌氧技术; 微好氧培养基用不加还原剂半胱氨酸和指示剂刃天青的厌氧培养基, 37℃ 培养一周。

1.4.3 生长条件试验: 用 721 型分光光度计在 660nm 处测量最适盐浓度、最适温度和最适 pH 等的生长情况。

1.4.4 芽孢试验: 用水浴 80℃ 保温 10min 或与培养液等量的 95% 乙醇 20℃ 45min 处理方法检验芽孢是否存在。

1.4.5 基质利用: 分离和生长培养基中的酪蛋白和酵母膏减少至 0.5g/L, 用高压液相色谱测定葡萄糖发酵产物; 以 5% 糖和醇类分别代替葡萄糖, 测定糖和醇类利用情况, 指示剂用溴甲酚紫。

1.4.6 常规生理生化特性: 水解淀粉、明胶液化、吡啶试验、H₂S 测定、硫酸盐还原等生理生化反应^[9]

2 结果

2.1 形态特征

SEM 菌株为革兰氏阴性杆菌, 不运动, 菌体大小为 0.5×6.0μm 左右。

在 37℃ 培养一周, 其滚管培养基上的菌落直径为 1mm 左右, 表面光滑湿润, 圆形, 边缘整齐。

2.2 厌氧试验

SEM 菌株对氧敏感, 在好氧和微好氧环境中生长受抑制, 只在厌氧条件下生长, 说明为严格厌氧菌。

2.3 生长条件试验

SEM 菌株在 12.5%~17.5% NaCl 浓度培养基中生长较好, 低于 8% 和高于 25% 时不生长。这与冬尖发酵盐浓度 (16.1%) 相一致。在 10%, 15% 和 20% NaCl 三种条件下, SEM 菌株在 15% NaCl 中生长较快, 而且细胞产量也较多。

SEM 菌株生长温度范围为 25℃~45℃, 最适生长温度 35℃~40℃。pH 范围为 6.0~

8.0, 最适 pH 为 7.5。

2.4 芽孢试验

经水浴 80℃ 保温 10min 或乙醇处理后, 该菌不能生长, 说明没有芽孢生成。

2.5 基质利用

SEM 菌株利用葡萄糖、果糖、纤维二糖、乳糖、蔗糖、丙三醇、山梨醇, 不利用麦芽糖、木糖、核糖, 见表 1。SEM 菌株发酵葡萄糖产生丙酸和己酸。

表 1 SEM 菌株对糖和醇类的利用情况

底物	葡萄糖	果糖	纤维二糖	乳糖
结果	+	+	+	+
底物	麦芽糖	半乳糖	核糖	丙三醇
结果	-	+	-	+
底物	木糖	蔗糖	山梨醇	
结果	-	+	+	

2.6 常规生理生化特性

SEM 菌株不能水解淀粉; 不能由色氨酸产生吡啶; 不能还原硝酸盐; 能液化明胶, 能生成 H₂S。

3 讨论

1937 年, Baumgartner 从腌鱼中首次分离到一株厌氧嗜盐菌^[9], 但现在该菌株已不存在。1983 年以来, Zeikus 和 Oren 等人分别从盐湖和死海中分离到几株厌氧嗜盐菌, 为 *Clostridium lortetii*^[5], *Halobacteroides halobius*^[6], *Haloanaerobides praevalens*^[4], *Halobacteroides acetothylicus*^[7], *Sporohalobacter marismortui*^[8], 对其特殊的机理和分类地位作了初步探讨, 并提出了一个新科 Haloanaerobiaceae, 其特征为“专性厌氧, 嗜盐的发酵细菌, 其细胞壁为革兰氏阴性”。

SEM 菌株生长依赖于高盐浓度 (12.5%~17.5% NaCl), 严格厌氧, 革兰氏阴性杆菌, 从这些特征看, SEM 菌株应归属于厌氧嗜盐菌 (Haloanaerobe)。但是, 表 2 显示了 SEM 菌株与已知的厌氧嗜盐菌的差异, SEM 菌株生长于蔬菜盐腌过程中, 已知菌生长于死海和盐湖中; SEM 菌株生长所需的 NaCl 浓度较高为

表2 SEM菌株与已知厌氧嗜盐菌的比较

特征	<i>Clostridium lortetii</i> ^[4]	<i>Halobacteroides halobius</i> ^[5]	<i>Haloanaerobium praevalens</i> ^[2]	<i>Halobacteroides acetoehtylicus</i> ^[7]	<i>Sporohalobacter marismortui</i> ^[6]	SEM
形态	杆状	杆状	杆状	杆状	杆状	杆状
革兰氏染色	—	—	—	—	—	—
大小/ μm	0.5~0.6× 2.5~10	0.5×10 ~20	0.5×1.5	0.4~0.7× 1~1.6	0.6×3 ~13	0.5×6.0
pH	没报道	没报道	6~8	5.4~8	没报道	6~8
μC	37~45	37~42	15~45	15~45	25~50	25~45
NaCl浓度 ($\rho/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	6~12	8~17	5~25	6~20	3~18	8~25
芽胞	+	-	-	-	+	-
运动	+	+	-	+	+	-
生境	死海	死海	大盐湖	地下深层	死海	盐腌冬尖
葡萄糖	乙酸、丁酸	乙酸、乙醇	乙酸、丁酸	乙酸、乙醇	乙酸、乙醇	丙酸、己酸
发酵产物	H_2/CO_2	H_2/CO_2	CO_2/H_2	CO_2/H_2	CO_2/H_2	

8%~25%，只有 *H. Praevalens* 生长 NaCl 浓度相接近，为 5%~25%，其它种都低于 20% NaCl 生长浓度；SEM 菌株因冬尖在室外经 3~4a 发酵形成，其生长温度随天气一年四季变化而变化，并且温度波动较大，这是已知菌无法相比的；SEM 菌株发酵葡萄糖产生丙酸和己酸，而已知菌则产生乙酸、丁酸、乙醇和 H_2/CO_2 等，产物存在较大的差异。另外，SEM 菌株是首次从蔬菜发酵中分离出的一株厌氧嗜盐菌，因而，是否为新种、尚有待于进一步确定。

参 考 文 献

[1] Staley J T, Bryant M P, Pfenning N(eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 3. Baltimore,

Williams and Wilkins. 1989, PP 1654~1658, 2216~2233.

- [2] Zeikus J G, Hegge P W, Thompson T E. *Curr Microbiol.* 1983, 9: 225~234.
- [3] 斯佩克 M L. *食品微生物检验方法提要*, 北京: 人民卫生出版社, 1982, 66.
- [4] Oren A. *Arch Microbiol.* 1983, 136: 42~48.
- [5] Oren A, Weisburg W G, Kessel M. *System App Microbiol.* 1984, 5: 58~70.
- [6] Oren A, Paster B J, Woese C R. *System Appl Microbiol.* 1984, 5: 71~80.
- [7] Rengpipat S, Langworthy T A, Zeikus J G. *System Appl Microbiol.* 1988, 11: 28~35.
- [8] Oren A, Pohla H, Stackebrandt E. *System Appl Microbiol.* 1987, 9: 239~246
- [9] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著. *一般细菌常用鉴定方法*, 北京: 科学出版社, 1978, 135~179.
- [10] Baumgartner J G. *Food Res.* 1937, 2: 321~329.

CHARACTERIZATION OF A HALOANAEROBE

Wan Bo Li Anming Zhao Hai Liu Kexin

(*Chengdu Institute of Biology, Academia Sinica, Chengdu 610041*)

Abstract The strain SEM was isolated from Salted Dongjian, SEM is Gram-negative, obligate anaerobic and halophilic, rod, with the size of single cell of $0.5 \times 6.0 \mu\text{m}$, and non-motil, non-sporeforming. Growth required 8%~25% NaCl with an optimum at 12.5%~17.5% NaCl, sugars and alcohols were utilized, the main products of glucose fermentation were propionate and caproic acid. SEM belong to haloanaerobe. SEM differs from several known species of haloanaerobe. It is probably a new species.

Key words Anaerobic, Halophilic, Haloanaerobe